

審査の結果の要旨

氏名 高倉 美菜香

本研究はインスリン受容体 (*INSR*) 遺伝子および同じ蛋白質ファミリーである IGF-1 受容体 (*IGF1R*) 遺伝子のチロシンキナーゼドメインにおける蛋白質立体構造変化と表現型の関連 (structural-phenotype correlation) について検討したものである。*in silico* 蛋白立体構造解析の手法を用いて、同部位に存在する変異およびバリエーションによる蛋白立体構造変化と機能への影響の関連を検討し、*IGF1R* 遺伝子における一部の變異については培養細胞を用いた機能解析を行い下記の結果を得ている。

1. *INSR* 遺伝子のチロシンキナーゼドメインに存在するインスリン受容体異常症 A 型の原因となるミスセンス変異を Human Gene Mutation Database (HGMD)、NCBI ClinVar、UniProt データベースから抽出し、出典となった論文を確認し、インスリン受容体異常症 A 型の原因として矛盾しない 13 箇所のアミノ酸残基で報告された変異を抽出した。同様に *IGF1R* 遺伝子の同ドメインに存在する IGF-1 受容体異常症の原因となるミスセンス変異についても抽出し、出典となった論文を確認し、IGF-1 受容体異常症の原因として矛盾しない変異を 4 個抽出した。また *INSR* 遺伝子および *IGF1R* 遺伝子のチロシンキナーゼドメインに存在するアレル頻度 0.1% 以上のミスセンスバリエーションを 1000 Genomes Project、東北メディカル・メガバンクデータベース、ESP6500、HGVD データベースを用いて、*INSR* 遺伝子において 4 個、*IGF1R* 遺伝子において 3 個抽出した。
2. *INSR* 遺伝子チロシンキナーゼドメインに存在するインスリン受容体異常症 A 型の原因として抽出した 14 個のミスセンス変異について(1) ATP 結合への影響、(2) 活性部位への影響、(3) 活性化 (自己リン酸化) への影響、(4) β -subunit 内のダイマー形成への影響、(5) ドメイン構造そのものの安定性への影響などを調べるために *in silico* 構造解析を行った。(1) ATP 結合部位周辺の変異として G1035V、A1055V が存在した。これらの変異は、ATP との構造上衝突 (steric clash) が推察され、チロシンキナーゼドメインの ATP 結合能を損なうと予測された。(2) 活性部位 (catalytic base) 周辺の変異として、H1157R、A1161T、A1162E、N1164T が存在し、いずれの変異も活性部位である Asp1159 を含む catalytic loop に存在し、活性部位 Asp1159 あるいは周辺のアミノ酸残基に影響を及ぼし、活性の発現に必要な立体構造や水素結合ネットワークを壊すことが推察された。これらの変異は、直接活性部位に影響を及ぼし、酵素活性を損なうと予測された。(3) 自己リン酸化において重要な領域に存在する変異として、activation loop に存在する M1180I、P+1 loop に存在する R1201Q、R1201W、APE モチーフに存在する P1205L、E1206D が挙げられた。いずれの変異も周囲の構造と steric clash を引き起こすか、相互作用消失をもたらす、自己リン酸化や活性型への構造変化に影響

響を及ぼすと推察された。(4)ダイマー形成への影響が推察される変異として、ダイマーインタフェースに存在する A1075D が挙げられた。この変異により活性部位周辺の ATP の位置が不安定化し基質へのリン酸基転移が障害されることが推察された。また(5)チロシンキナーゼドメインの機能に直接影響せず、構造そのものを不安定化する変異として、W1220L、G1146R が存在し、これらの変異は、水素結合や疎水性相互作用の欠失および立体障害により、チロシンキナーゼドメインの構造を不安定化すると推察された。一方、一般集団において認められた *INSR* 遺伝子チロシンキナーゼドメインのミスセンスバリエント (アレル頻度 0.1%以上) として、S1033F、L1065V、R1128H、S1221A が存在したが、この内、機能に重要な部位に存在するものは S1033F のみであった。同バリエントは ATP 結合部位に存在したが、*in silico* 構造解析では ATP 及び周辺構造との立体構造障害は見られなかった。これ以外の 3 つのバリエントに関しても、変異による立体構造障害がみられないか、または周囲の構造の安定性を局所的に減少させるにとどまることが予測され、チロシンキナーゼドメインの機能の発現に重要な部位に影響を与えたり、ドメインの構造を大きく不安定化する可能性は低いと考えられた。

3. *IGF1R* 遺伝子チロシンキナーゼドメインに存在する *IGF1R* 異常症の原因変異 4 個について、同受容体への機能的影響を調べるために構造解析を行った。このうち 3 個 (E1050K、D1135E、G1155A) は、チロシンキナーゼドメインの機能の発現に寄与する部位に存在した。Glu1050 は kinase 活性に必要とされる $\beta 3$ - αC の salt bridge を形成する残基である。Asp1135 は kinase の触媒部位そのものであり、Gly1155 は activation loop 中の DFG モチーフの Gly である。R1256S の Arg1256 は、APE モチーフの Glu1182 と salt bridge を形成する残基である。いずれの変異も *IGF1R* のチロシンキナーゼドメインの kinase 活性の発現に重要な部位に影響することが推察された。E1050K、D1135E、G1155A については培養細胞で変異体を作成し、IGF-1 刺激で野生型と比較し、自己リン酸化の減弱を認めた。一方、一般集団で認められた *IGF1R* 遺伝子チロシンキナーゼドメインのミスセンスバリエント (アレル頻度 0.1%以上) として T1000I、V1195L、R1246H が存在した。これらのバリエントは、いずれもチロシンキナーゼドメインの機能に重要な部位には存在せず、構造解析におけるアミノ酸置換によっても機能の発現に重要な部位や同ドメインの構造全体への影響は認めなかった。このことからチロシンキナーゼドメインの機能の発現に重要な部位に影響を及ぼしたり、またはドメインの構造を大きく不安定化する可能性は低いと考えられた。

以上、本論文では *in silico* 蛋白立体構造解析を行い、*INSR* 遺伝子および *IGF1R* 遺伝子のチロシンキナーゼドメインに存在するミスセンス変異は同ドメイン機能の発現に影響を及ぼすことが推察された一方、バリエントによる構造変化の影響は局所的であり、ドメイン機能の発現への影響はないか軽微であると推察された。このことから、これまで *INSR* 遺伝子の他のドメインや他遺伝子で存在が確認されていた structural-phenotype correlation が *INSR* 遺伝子および *IGF1R*

遺伝子チロシンキナーゼドメインでも存在する可能性が示唆され、受容体異常症の早期診断および発症メカニズム解明に有用な知見が得られ、学位の授与に値するものと考えられる。